

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN ANGGUR (*Vitis vinifera* L.)
DAN FRAKSI-FRAKSINYA TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus*
aureus DAN *Staphylococcus epidermidis***

NASKAH PUBLIKASI



Oleh:
NINA NUR ROFIKAYATI
K100100128

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2014

PENGESAHAN NASKAH PUBLIKASI

Berjudul:


AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN ANGGUR (*Vitis vinifera* L.) DAN FRAKSI-FRAKSINYA TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Staphylococcus epidermidis*

Oleh:

**NINA NUR ROFIKAYATI
K100 100 128**

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada tanggal : 26 Juni 2014

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Dekan,


Azis Saifudin, Ph.D., Apt

Penguji:

1. Ratna Yuliani, M.Biotech.St
2. Tanti Azizah Sujono, M.Sc., Apt
3. Rima Munawaroh, M.Sc., Apt
4. Ika Trisharyanti DK, M.Farm., Apt

1. 

2. 

3. 

4. 

AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN ANGGUR (*Vitis vinifera* L.) DAN FRAKSI-FRAKSINYA TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Staphylococcus epidermidis*

ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT AND ITS FRACTION OF GRAPE LEAVES (*Vitis vinifera* L.) AGAINST *Staphylococcus aureus* AND *Staphylococcus epidermidis*

Nina Nur Rofikayati, Rima Munawaroh dan Ika Trisharyanti D. K.

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jl.Ahmad Yani Tromol Pos I, Pabelan Kartasura Surakarta 57102
Email : ninanurrofikayati@yahoo.com

ABSTRAK

Tanaman anggur (*Vitis vinifera* L.) merupakan tanaman yang digunakan untuk mengobati infeksi bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol-air ekstrak etanol daun anggur terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. Daun anggur diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan penyari etanol 96% dan kemudian difraksinasi dengan metode partisi. Uji aktivitas antibakteri digunakan metode difusi disk dengan seri konsentrasi 600; 700; 800; 900; dan 1000 µg/disk dari fraksi n-heksan, etil asetat, etanol-air ekstrak etanol daun anggur. Uji tabung dan KLT digunakan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ketiga fraksi tersebut. Hasil aktivitas ekstrak etanol daun anggur dan fraksi-fraksinya terhadap *S. aureus* tidak memiliki zona hambat kecuali pada konsentrasi 700 µg/disk dengan zona hambat irradikal (12.5 ± 1.3 mm), sedangkan terhadap *S. epidermidis* fraksi n-heksan dengan konsentrasi 1000 µg/disk mampu membuat zona irradikal sebesar 13 ± 2.5 mm yang dibandingkan dengan fraksi etil asetat sebesar 15.25 ± 0.25 mm dan fraksi etanol-air sebesar 15.5 ± 0 mm. Uji fitokimia menunjukkan adanya kandungan senyawa fenol, flavonoid, dan terpenoid pada fraksi etanol-air, etil asetat, dan n-heksan.

Kata kunci: *Vitis vinifera* L., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*

ABSTRACT

Plant grapes (Vitis vinifera L.) is a plant used to treat bacterial infections. This study aims to determine the antibacterial activity of n-hexane fraction, ethyl acetate, ethanol-water and ethanol extracts of grape leaves against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Grape leaves were extracted using maceration with 96% ethanol and then fractionated by partitioning method. Antibacterial activity test used disk diffusion method with a concentration series 600; 700; 800; 900; and 1000 mg / disc of the fraction of n-hexane, ethyl acetate, ethanol-water extract of grape leaf ethanol. Test tubes and TLC is used to determine the compounds contained in the third fraction. The results of the activity of the ethanol extract and grape leaves fractions against S. aureus has no inhibitory zone except at a concentration of 700 ug / disc with irradikal inhibition zone (12.5 ± 1.3 mm), while the n-hexane fraction S.epidermidis with a concentration of 1000 ug/disk irradikal able to create a zone of 13 ± 2.5 mm compared with the ethyl acetate fraction was 15.25 ± 0.25 mm and ethanol-water fraction was 15.5 ± 0 mm. Phytochemical test shows that it contains phenolic compounds, flavonoids, and terpenoids in fractions of ethanol-water, ethyl acetate and n-hexane.

Keywords: Vitis vinifera L., Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi terjadi akibat bakteri, virus, parasit, dan jamur (Jawetz *et al.*, 2001) yang masuk ke dalam tubuh inang mengadakan pertumbuhan atau replikasi (Pratiwi, 2008). Dari berbagai faktor yang ada, diketahui bahwa bakteri merupakan faktor yang tidak kalah penting dalam menyebabkan penyakit infeksi (Brooks *et al.*, 2001).

Bakteri penyebab infeksi pada manusia, diantaranya adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. Hampir semua orang pernah mengalami infeksi *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* selama hidupnya, dengan derajat keparahan yang beragam, dari keracunan makanan atau infeksi kulit ringan hingga infeksi berat yang mengancam jiwa (Jawetz *et al.*, 2001). *Staphylococcus epidermidis* merupakan salah satu spesies bakteri dari genus *Staphylococcus* yang diketahui dapat menyebabkan infeksi oportunistik, sedangkan *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan jerawat, infeksi folikel rambut atau abses (Jawetz *et al.*, 2001).

Tanaman anggur merupakan tanaman tradisional yang digunakan untuk mengobati infeksi bakteri tersebut, karena memiliki kandungan senyawa seperti resveratrol, hidroksitirosol, kuersetin, dan asam fenolat (Papadopoulou *et al.*, 2004), beberapa katekin, epikatekin (Jayaprakarsha *et al.*, 2003) serta alkaloid terpenoid. Daun anggur menunjukkan aktivitas antimikroba spektrum luas (Oskay & Sari 2007) terhadap beberapa bakteri Gram positif dan negatif yang ditunjukkan adanya zona hambat terhadap *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Staphylococcus subfava* (Parekh *et al.*, 2009). Hasil dari penelitian Parekh *et al.* (2006) secara invitro terhadap ekstrak air dan etanol daun anggur dengan volume 100 μ L memiliki aktivitas dengan zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 10 mm dan 15 mm. Penelitian Parekh *et al.* (2006) menunjukkan bahwa ekstrak air dan etanol daun anggur dengan volume 100 μ L memiliki aktivitas dengan zona hambat terhadap *Staphylococcus epidermidis* sebesar 11 mm dan 12 mm. Ekstrak etanol mempunyai Konsentrasi Hambat Minimum terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* sebesar $0,98 \pm 0,16$ mg/mL, *Bacillus cereus* sebesar $0,65 \pm 0,16$ mg/mL, dan *Campylobacter jejuni* sebesar $0,65 \pm 0,16$ mg/mL (Abramovic, *et al.*, 2012).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol-air ekstrak etanol daun anggur (*Vitis vinifera* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah : neraca analitik (Ohaus®), *waterbath* WNB-14 (Mettler®), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph®), mikroskop (CX21 Olympus®), autoklaf (MA 672®), oven (Mettler®), *Laminar Air Flow* (Astari Niagara®), inkubator (Mettler®), inkubator shaker (Excelsa 24®) dan alat-alat gelas.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah : daun anggur (*Vitis vinifera* L) yang diperoleh dari kota Kartasura; bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta dan *Staphylococcus epidermidis* yang diperoleh dari Laboratorium RSUD Moewardi Surakarta; n-heksan, etil asetat, etanol, akuadest; media MH (Oxoid dan Merck®); NaCl (Merck®); disk antibiotik (siprofloksasin dan levofloksasin); cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D; lempeng KLT silika GF₂₅₄ (Merck); pereaksi semprot FeCl₃, sitroborat, Dragendorff.

Jalannya Penelitian:

Identifikasi Daun Anggur

Identifikasi daun anggur dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta untuk mengetahui kebenaran daun anggur yang digunakan. Identifikasi dilakukan dengan cara mencocokkan ciri-ciri daun anggur dengan ciri-ciri daun anggur pada pustaka.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Pembuatan ekstrak etanol daun anggur dilakukan dengan metode maserasi. Simplisia daun anggur sebanyak 3000 g dimasukkan ke dalam tabung maserasi dan direndam dalam cairan penyari etanol sebanyak 22500 mL, ditutup rapat, didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, dan seringkali diaduk. Maserat disaring dengan menggunakan corong Buchner. Ampasnya dimaserasi kembali dengan perlakuan sama. Maserat yang didapat kemudian dicampur dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental daun anggur.

Fraksinasi dilakukan dengan cara 10 gram ekstrak kental ditambah dengan 100 mL etanol : air (1:1 v/v), diaduk-aduk sampai larut, dimasukkan corong pisah, dipartisi dengan 100 mL n-heksana, fase n-heksana dipisahkan, fase etanol-air dipartisi lagi dengan n-heksana. Fase etanol-air dipartisi lagi dengan n-heksan sampai tidak terdapat bercak pada KLT saat dilihat pada UV 366. Fase etanol-air kemudian dipartisi dengan etil asetat dengan volume sama banyak. Fraksinasi dengan etil asetat juga dilakukan sampai tidak terdapat lagi bercak pada KLT saat dilihat pada UV 366. Fase etanol-air yang tak larut etil asetat

disebut fase polar. Fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air dipekatkan. Hasil fraksi n-heksan dan fraksi etanol-air digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat gelas (cawan petri, tabung reaksi, pipet volume, labu takar, Erlenmeyer) dicuci bersih, kemudian dikeringkan, dibungkus kertas, dan disterilkan dengan oven pada suhu 160-180° C selama 1-2 jam. Bahan seperti media, *yellow* dan *blue tips* disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Ose disterilkan dengan cara dibakar di atas api.

Pengecatan Gram bakteri

Suspensi bakteri masing-masing diambil 1 ose dan diratakan pada obyek gelas yang telah dibebaslemakkan dengan dipanasi di atas nyala bunsen hingga kering kemudian ditetesi formalin 1%, ditunggu 5 menit kemudian dikeringkan lagi dan preparat siap dicat. Preparat yang telah siap dicat digenangi dengan cat Gram A selama 1-3 menit kemudian cat dibuang tanpa dicuci dengan air. Preparat kemudian digenangi dengan cat Gram B selama 0,5-1 menit. Setelah itu cat dibuang dan dicuci dengan air. Preparat kemudian ditetesi cat Gram C sampai warna cat dilunturkan. Preparat selanjutnya digenangi cat D selama 1-2 menit kemudian dicuci dan dikeringkan dalam udara kamar. Selanjutnya, preparat siap diperiksa di bawah mikroskop perbesaran 1000 kali.

Uji biokimiawi

Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* digoreskan pada agar garam manitol (Manitol Salt Agar = MSA), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Uji aktivitas antibakteri

Media MH sebanyak 20 mL dipadatkan dalam cawan petri, kemudian dimasukkan 300 µL suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL dan diratakan menggunakan gelas spreader. Masing-masing dari konsentrasi akhir adalah 600 µg/disk, 700 µg/disk, 800 µg/disk, 900 µg/disk, dan 1000 µg/disk diambil 10 µL dan dimasukkan dalam disk yang kosong dan ditunggu 15 menit. Selanjutnya disk diletakkan diatas media dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Zona hambatan yang terbentuk diukur menggunakan penggaris. Kontrol negatif yang digunakan yaitu etanol 96 % 10 µL/disk sedangkan kontrol positif yang digunakan yaitu disk siprofloksasin untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan disk antibiotik levofloksasin untuk bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

Uji Fitokimia

a. Uji Tabung

1) Identifikasi Golongan Senyawa Alkaloid

Lima miligram sampel dalam 2 mL kloroform ditambah dengan 2 mL amonia dan disaring. Filtrat ditambah H_2SO_4 pekat 3-5 tetes. Kemudian dikocok sampai membentuk dua lapisan. Lapisan yang tidak berwarna diuji dengan menambahkan reagen pereaksi Marquis, Mayer, dan Dragendorff, berwarna kuning sampai merah lembayung, putih keruh, dan jingga menyatakan adanya alkaloid (Febriany, 2004 dan Harborne, 1987)

2) Identifikasi Golongan Senyawa Fenol

Larutan uji hasil ekstraksi dimasukkan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan pereaksi FeCl_3 dalam larutan etanol, hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna hijau, merah ungu, biru dan hitam (Tiwari *et al.*, 2011)

3) Identifikasi Senyawa Flavonoid

Larutan uji hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi butiran logam Mg dan larutan HCl 2N, campuran ini dipanaskan selama 5-10 menit, setelah dingin disaring, kedalam filtrat ditambahkan amil alkohol dikocok kuat-kuat, warna merah atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Harborne, 1987)

4) Identifikasi Golongan Senyawa Terpenoid

Larutan uji hasil ekstraksi diletakkan pada plat tetes, kemudian ditambahkan vanillin dan H_2SO_4 pekat, Perubahan warna coklat kemerahan pada permukaan dalam larutan menunjukkan hasil positif adanya terpenoid (Edeoga *et al.*, 2005)

b) Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Silika gel GF 254 yang akan digunakan diaktifkan dulu dengan cara dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam. Larutan uji dibuat stok dengan konsentrasi 10% b/v dalam etanol 96% ditotolkan pada fase diam sebanyak 3 kali totolan, setiap totolan dibiarkan sampai kering, kemudian dielus 5 cm untuk ekstrak etanol menggunakan fase gerak etilasetat : asam format : air (90:5:5 v/v), fraksi n-heksan daun anggur digunakan fase gerak n-heksan : etilasetat (1:1 v/v), fraksi etilasetat daun anggur digunakan fase gerak n-heksan : etilasetat (1:1 v/v). Hasil kromatografi yang diperoleh diamati pada UV 254 nm, UV 366 nm, dan dideteksi dengan pereaksi semprot FeCl_3 (polifenol/tanin), sitroborat (flavonoid), Dragendorff (alkaloid), dan anisaldehida- H_2SO_4 (terpenoid) untuk mengetahui senyawa daun anggur seperti senyawa flavonoid, fenolik, terpenoid, dan alkaloid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Daun Anggur

Identifikasi daun anggur dilakukan untuk mengetahui kebenaran daun anggur yang digunakan. Identifikasi dilakukan dengan cara mencocokkan ciri-ciri daun anggur dengan daun anggur pada buku determinasi. Identifikasi daun anggur dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta yang menunjukkan bahwa daun yang diidentifikasi adalah daun *Vitis vinifera* L. (anggur).

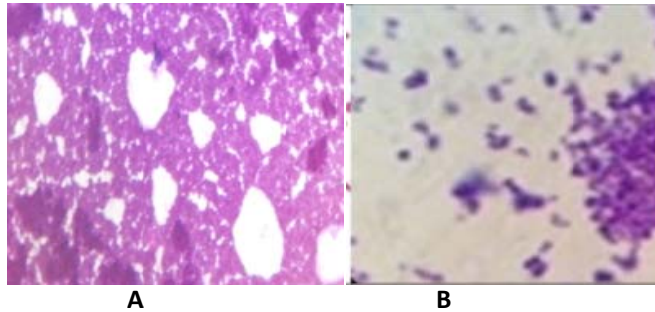
Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi dipilih karena proses pembuatan ekstrak yang mudah dan alat yang digunakan relatif sederhana, tetapi metode ini mempunyai kelemahan yaitu waktu pengerjaannya memerlukan waktu yang cukup lama dan memerlukan cairan penyari dalam jumlah banyak. Maserasi ini menggunakan pelarut etanol 96%, pelarut ini dipilih sebagai penyari karena bersifat universal, tidak beracun, dan bersifat netral. Hasil ekstrak kental daun anggur diperoleh rendemen sebanyak 14,73 %, dari 3000 g serbuk daun anggur menjadi 441,886 g ekstrak.

Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi cair-cair dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air-etanol. Pemilihan metode ini karena pengerjaannya relatif mudah dan sangat efektif sebagai langkah pertama dalam pemisahan ekstrak kasar (Sharker *et al.*, 2006). Rendemen fraksi n-heksan diperoleh 13,11 g, fraksi etil asetat 21,15 g, dan fraksi etanol-air 3,09 g.

Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri *S. aureus* dan *S. epidermidis* dilakukan dengan metode pengecatan Gram untuk mengetahui golongan bakteri. Pada pewarnaan Gram, bakteri yang telah difiksasi dengan panas akan membentuk noda pada kaca objek kemudian diwarnai dengan cat Gram A berisi kristal violet. Selanjutnya pewarna dicuci dan pada bakteri ditetesi iodine sebagai cat Gram B. Setelah iodine dicuci maka akan tampak warna ungu selanjutnya noda dicuci dengan alkohol (cat Gram C) yang merupakan *decolorizing agent*. Kemudian bakteri diberi cat Gram D yang berisi safranin. Pewarnaan Gram terlihat bakteri berbentuk bulat, berwarna ungu, dan bergerombol seperti buah anggur (Gambar 1). *S. aureus* dan *S. epidermidis* mempertahankan zat warna cat gram A yang mengandung kristal violet. Ketika pencucian dengan alkohol, bakteri Gram positif akan mengalami denaturasi protein pada dinding selnya, sehingga protein menjadi keras dan beku, pori-pori mengecil dan warna ungu dari kristal yodium dipertahankan sehingga bakteri tetap berwarna ungu (Pratiwi, 2008). Bakteri *S. aureus* dan *S. epidermidis* yang digunakan menunjukkan warna ungu pula (Gambar 1 dan Tabel 1).

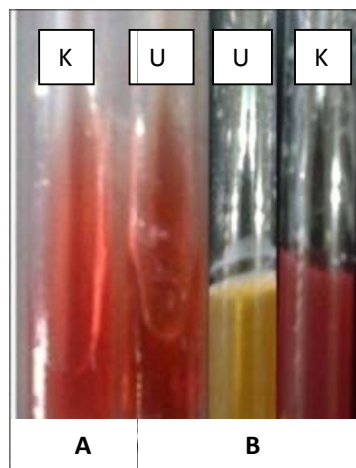


Gambar 1. Pengecatan bakteri (A) *Staphylococcus epidermidis* (B) *Staphylococcus aureus*

Tabel 1. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus aureus*

Pengamatan	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Pengecatan	Gram positif	Gram positif
Susunan sel	Menggerombol	Menggerombol
Warna sel	Ungu	Ungu
Bentuk sel	Bulat	Bulat

Identifikasi selanjutnya menggunakan uji biokimia yaitu dengan menggunakan media MSA (*Manitol Salt Agar*). Media MSA digunakan untuk melihat kemampuan memfermentasi manitol pada bakteri jenis *Staphylococci*. Hasil yang diperoleh pada uji biokimia *Staphylococcus aureus* terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning karena mampu memfermentasi manitol (Gambar 2, Tabel 2). Hasil yang diperoleh pada uji biokimia *Staphylococcus epidermidis* tidak terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning, sebab *Staphylococcus epidermidis* tidak dapat memfermentasi manitol dalam keadaan anaerob (Sujudi *et al.*, 1993).



Gambar 2. Hasil Uji Identifikasi Bakteri *S. epidermidis* (A) dan *S. aureus* (B) menggunakan media *Manitol Salt Agar* (MSA).

Keterangan :

K : Kontrol (Media MSA)

U : Uji identifikasi bakteri yang ditanam di MSA

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol-air ekstrak etanol daun anggur dilakukan dengan metode difusi Kirby bauer dengan menggunakan media agar Mueller Hinton (MH). Metode difusi ini dipilih karena mudah dan sederhana dalam pengerjaannya. Kontrol negatif yang digunakan adalah etanol 96% yang berfungsi sebagai pembanding untuk mengetahui adanya aktivitas menghambat bakteri. Sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin dan levofloksasin, *S. aureus* dan *S. epidermidis*, sensitif terhadap antibiotik tersebut.

Fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol-air ekstrak etanol daun anggur menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. epidermidis* dan tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* (Tabel 3). Perbedaan kemampuan aktivitas antibakteri disebabkan karena bakteri *S. aureus* mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigen (Radji, 2010) sedangkan bakteri *S. epidermidis* tidak mempunyai protein A pada dinding sel yang bersifat sebagai antigen (Radji, 2010) sehingga bakteri *S. aureus* tidak mudah untuk dibunuh.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas ekstrak etanol dan fraksi-fraksinya daun anggur terhadap *S. aureus* dan *S. epidermidis*

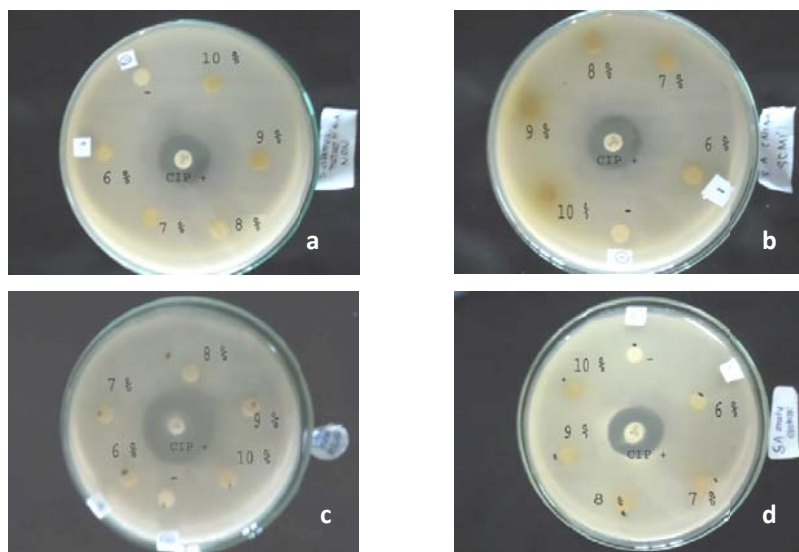
Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	diameter zona hambatan (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Ekstrak 600 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	12*
Ekstrak 700 $\mu\text{g}/\text{disk}$	12,5 \pm 1,3*	11,5 \pm 0,4*
Ekstrak 800 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	11,3 \pm 0,9*
Ekstrak 900 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	11,67 \pm 0,47*
Ekstrak 1000 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	11 \pm 0,7*
F. n-heksan 600 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	-
F. n-heksan 700 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	-
F. n-heksan 800 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	-
F. n-heksan 900 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	-
F. n-heksan 1000 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	13 \pm 2,5*
F. Etil asetat 600 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	10,75 \pm 0,75*
F. Etil asetat 700 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	10,25 \pm 1,25*
F. Etil asetat 800 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	13,75 \pm 0,75*
F. Etil asetat 900 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	15 \pm 0,5*
F. Etil asetat 1000 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	15,25 \pm 0,25*
F. Etanol-air 600 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	10,25 \pm 0,25*
F. Etanol-air 700 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	11,5 \pm 0,5*
F. Etanol-air 800 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	12,5 \pm 0,5*
F. Etanol-air 900 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	15,5 \pm 0,5*
F. Etanol-air 1000 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	15,5 \pm 0*
K+(1)siprofloksasin 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$	19,67 \pm 2,7	22 \pm 1,38
K+(2)levofloksasin 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$	32,2 \pm 1,22*	33,9 \pm 1,13*
K- etanol 96%	-	-

Diameter disk = 6 mm, * Zona irradikal, - Tidak ada zona hambat K+(1) Ciprofloksasin K+(2) Levofloksasiin

Hasil ekstrak etanol daun anggur terhadap bakteri *S. aureus* tidak terbentuk zona hambat yang tertera pada gambar 3. Ekstrak etanol pada konsentrasi 700 $\mu\text{g}/\text{disk}$ mampu

membuat zona irradikal sebesar $12,5 \pm 1,3^*$ mm, jika dibandingkan dengan ekstrak etanol pada bakteri *S. epidermidis* membentuk zona hambat sebesar $11,5 \pm 0,4^*$ mm menunjukkan hasil yang lebih kecil.

Fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol-air daun anggur tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dibandingkan dengan ekstrak etanol. Hal tersebut kemungkinan pada ekstrak terdapat senyawa metabolit kompleks yang bekerja dengan efek komplementer sebagai antibakteri yang memberikan efek yang berbeda dengan hasil fraksinasi yaitu dapat meningkatkan atau menurunkan potensi antibakteri berdasarkan dari kandungan di setiap fraksinya.

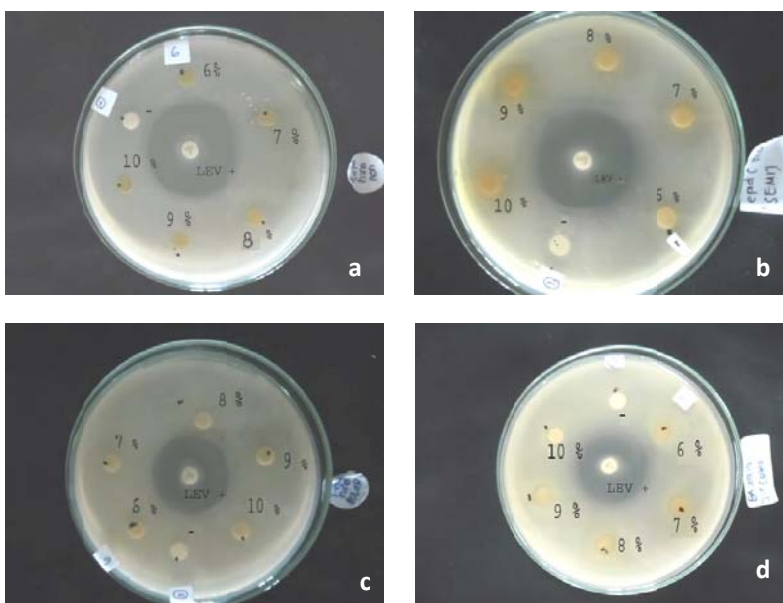


Gambar 3. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan (a), fraksi etil asetat (b), fraksi etanol-air (c), dan ekstrak etanol (d) bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 6% (1), 7% (2), 8% (3), 9% (4), 10% (5), K+ (6), K- (7)

Fraksi n-heksan, etil asetat, etanol-air dan ekstrak etanol daun anggur memiliki zona hambat pada bakteri *S. epidermidis* yang tertera pada gambar 4. Pada fraksi n-heksan dengan konsentrasi $1000 \mu\text{g}/\text{disk}$ mampu membuat zona irradikal sebesar $13 \pm 2,5$ mm yang dibandingkan dengan fraksi etil asetat sebesar $15,25 \pm 0,25$ mm dan fraksi etanol-air sebesar $15,5 \pm 0$ mm. Dari perbandingan fraksi tersebut antara fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air tidak terdapat perbedaan sedangkan hasil fraksi n-heksan memiliki hasil yang lebih kecil dari kedua fraksi tersebut. Jika dibandingkan dengan kontrol positif maka fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi etanol-air, dan ekstrak etanol daun anggur memiliki potensi sebagai antibakteri lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif levofloksasin.

Fraksi etanol-air lebih banyak menghambat bakteri *S. epidermidis* dibandingkan dengan fraksi etil asetat karena senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri banyak yang bersifat polar seperti senyawa fenol.

Ekstrak daun anggur pada penelitian ini jika dibandingkan dengan hasil penelitian Parekh *et al.* (2006) yang mampu memberikan zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus* (15 mm), *Staphylococcus epidermidis* (12 mm) maka ekstrak daun anggur pada penelitian ini tidak poten karena hanya membentuk zona irradikal dan hanya beberapa zona radikal. Hal ini kemungkinan disebabkan perbedaan tempat tumbuh tanaman daun anggur yaitu Maroko dan Indonesia (Kartasura) dan perbedaan kandungan nutrisi dalam tanaman anggur.



Gambar 4. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan (a), fraksi etil asetat (b), fraksi etanol-air (c), dan ekstrak etanol (d) bakteri *S. epidermidis* pada konsentrasi 6% (1), 7% (2), 8% (3), 9% (4), 10% (5), K+ (6), K- (7)

Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada fraksi n-heksan, etil asetat, etanol-air, dan ekstrak daun anggur menggunakan KLT dan uji tabung.

1. Uji Tabung

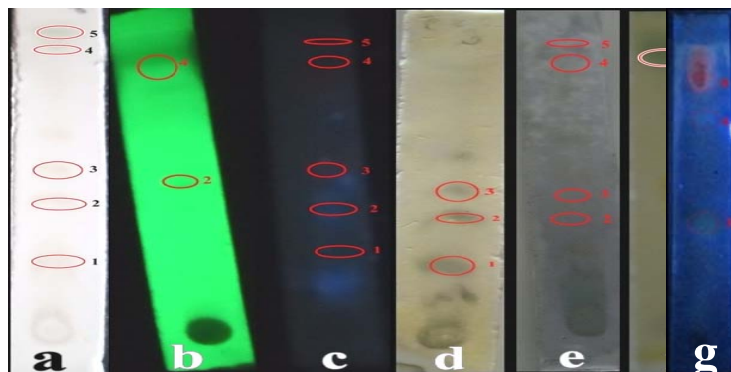
Pada Tabel 4 menunjukkan bahwa fraksi n-heksan daun anggur menunjukkan hasil negatif pada uji alkaloid dan untuk uji fenol, flavonoid dan terpenoid menunjukkan hasil positif. Pada fraksi etil asetat menunjukkan hasil positif pada uji fenol, flavonoid, dan terpenoid. Fraksi etanol-air positif mengandung fenol, flavonoid, dan terpenoid, namun negatif alkaloid, sedangkan pada ekstrak etanol daun anggur juga menunjukkan hasil yang sama pada fraksi etanol-air.

Tabel 4. Hasil uji skrining fitokimia dengan uji tabung

Uji fitokimia	Perubahan warna			
	Ekstrak Etanol daun anggur	Fraksi etanol-air daun anggur	Fraksi etil asetat daun anggur	Fraksi n-heksan daun anggur
Senyawa alkaloid	Tidak ada endapan (-)	Tidak ada endapan (-)	Tidak ada endapan (-)	Tidak ada endapan (-)
Senyawa fenol	Hitam (+)	Hijau kehitaman (+)	hijau kehitaman(+)	Hijau kehitaman (+)
Senyawa flavonoid	Kuning (+)	Oranye (+)	Oranye (+)	Oranye (+)
Senyawa terpenoid	Coklat kemerahan (+)	Coklat kemerahan (+)	Coklat kemerahan (+)	Coklat kemerahan (+)

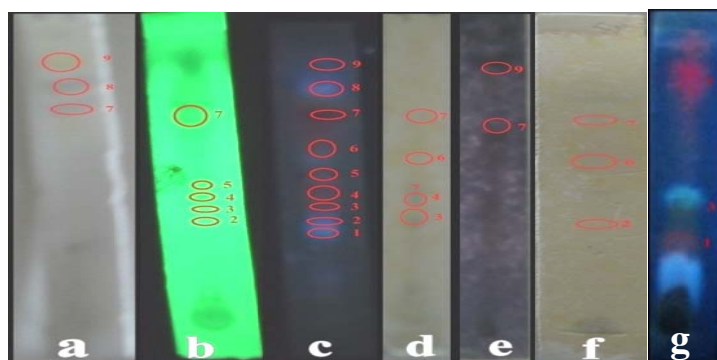
2. KLT

Kromatografi Lapis Tipis digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa dalam fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol-air ekstrak etanol daun anggur. Untuk mengelusi ekstrak etanol daun anggur menggunakan fase gerak etil asetat : as. Format : air (90:5:5 v/v). Hasil KLT untuk ekstrak etanol dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis ekstrak etanol daun anggur dengan fase diam : silika GF 254 nm dan fase gerak etil asetat : as. format : air (90:5:5 v/v). Dilihat dari sinar tampak (a), UV 254 nm (b), UV 366 nm (c), Dragendroff (d), anisaldehyd (e), FeCl₃ (f), dan sitroborat (g).

Pereaksi semprot yang digunakan yaitu Dragendorff yang ditandai dengan warna coklat (komplek kalium- alkaloid) (Svehla, 1990), pada hasil KLT bercak coklat pada hRf 46 dan 70 adalah alkaloid. FeCl₃ untuk mengetahui adanya fenolik yang ditandai warna hitam (Harborne, 1996) pada hRf 86 yang menunjukkan positif fenolik. Anisaldehyd untuk deteksi triterpen (Wagner dan Bladt, 1996) membentuk warna biru (Santosa, 2005), namun pada KLT tidak terbentuk adanya senyawa terpenoid. Sitroborat akan memberikan warna hijau kekuningan menunjukkan bahwa di dalam ekstrak atau fraksi mengandung flavonoid (Alam, 2011) yang ditunjukkan pada hRf 70, 86 dan 90 dan dari hasil didapatkan warna hijau hingga oranye yang membuktikan adanya senyawa flavonoid. Hal ini sesuai dengan uji tabung sebelumnya ekstrak etanol daun anggur mengandung senyawa flavonoid, fenol dan terpenoid.



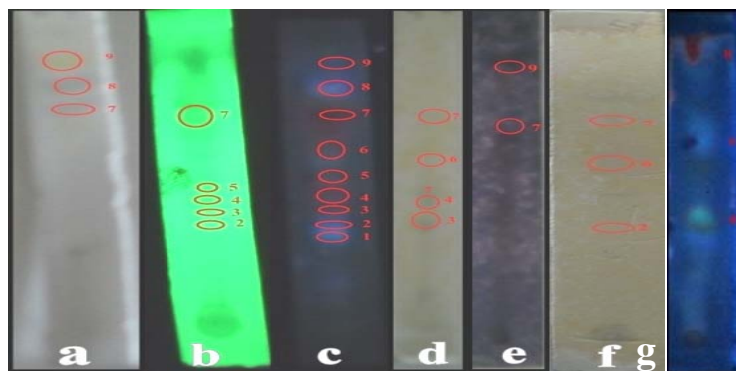
Gambar 6. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis fraksi n-heksan daun anggur dengan fase diam : silika GF 254 nm dan fase gerak n-heksan : etil asetat (1:1 v/v). Dilihat dari sinar tampak (a), UV 254 nm (b), UV 366 nm (c), Dragendroff (d), anisaldehyd (e), FeCl_3 (f), dan sitroborat (g).

Tabel 5. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis terhadap fraksi n-heksan daun anggur dengan fase gerak n- heksan : etil asetat (1:1 v/v) dan fase diam silika gel GF 254 (jarak elusi 5 cm).

Bercak	hRf	UV 254	UV 366	Pereaksi Semprot				Perkiraan Senyawa
				Dragendorff	FeCl_3	Anisaldehyd–asam sulfat	Sitroborat	
1	40	-	Hijau Biru	-	-	-	Oranye	-
2	42	Pemadaman	Merah	-	-	-	-	-
3	50	Pemadaman	Merah	Hijau	Hitam	-	Kuning-kehijauan	Fenol, Flavonoid
4	66	Pemadaman	Merah	Hijau	-	-	-	-
5	70	Pemadaman	Merah	-	-	-	-	-
6	78	-	Hitam	Hijau	Hitam	-	-	Fenol
7	84	Pemadaman	Hijau Biru	Hijau	Hitam	Coklat	Merah	Fenol
8	92	-	Merah	-	-	-	-	-
9	96	-	Merah	-	-	Coklat	-	-

Uji KLT fraksi n-heksan daun anggur digunakan fase gerak n-heksan : etil asetat (1:1 v/v) yang tertera pada Gambar 6, Tabel 5. Hal ini sesuai dengan hasil uji tabung pada fraksi n-heksan daun anggur yang mengandung flavonoid (hRf 50) dan fenol (hRf 50, 66 dan 70), hasil KLT tidak terdeteksi adanya senyawa terpenoid namun pada uji tabung menunjukkan hasil positif, hal itu dimungkinkan fase geraknya kurang optimal yang menyebabkan beberapa senyawa yang tertumpuk dan belum terpisah sehingga tidak terdeteksi saat disemprot dengan reagen.

Uji KLT pada fraksi etil asetat (Gambar 7, Tabel 6) daun anggur menunjukkan senyawa alkaloid (hRf 10, 30, 50, dan 94), fenol (hRf 20, 44, 50, 70, dan 90), dan flavonoid (hRf 44). Hal ini sesuai dengan skrining uji tabung untuk senyawa fenol, terpenoid dan untuk senyawa alkaloid tidak menunjukkan warna yang sesuai sehingga hasilnya negatif.



Gambar 7. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis fraksi etil asetat daun anggur dengan fase diam : silika GF 254 nm dan fase gerak n-heksan : etil asetat (1:1 v/v). Dilihat dari sinar tampak (a), UV 254 nm (b), UV 366 nm (c), Dragendroff (d), anisaldehyd (e), FeCl_3 (f), dan sitroborat (g).

Tabel 6. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis terhadap fraksi etil asetat daun anggur dengan fase gerak n- heksan : etil asetat (1:1 v/v) dan fase diam silika gel GF 254 (jarak elusi 5 cm).

Bercak	hRf	UV 254	UV 366	Pereaksi Semprot				Perkiraan Senyawa
				Dragendorff	FeCl_3	Anisaldehyd– asam sulfat	Sitroborat	
1	10	Pemadaman	-	Coklat	-	-	-	Alkaloid
2	20	Pemadaman	Coklat	-	Hitam	-	-	Fenol
3	30	-	Coklat	Coklat	-	-	-	Alkaloid
4	44	Pemadaman	Coklat	-	Hitam	Coklat	Kuning kehijauan	Fenol, Flavonoid
5	50	Pemadaman	Coklat	Coklat	Hitam	Coklat	-	Alkaloid, Fenol
6	70	-	Hijau	-	Hitam	-	Hijau-biru	Fenol
7	80	Pemadaman	Hijau	-	-	-	-	-
8	90	Pemadaman	Coklat	-	Hitam	-	Oranye	Fenol
9	94	Pemadaman	Orange	Coklat	-	Coklat	-	Alkaloid

Uji KLT fraksi etanol-air daun anggur tidak dilakukan karena sulit menentukan fase gerak yang dapat memisahkan senyawa-senyawa pada fraksi tersebut. Deteksi senyawa pada fraksi polar daun anggur menggunakan uji tabung yang diperoleh hasil positif mengandung alkaloid, fenol, flavonoid, dan terpenoid.

Senyawa golongan alkaloid yang mempunyai efek sebagai antibakteri dapat menghambat sintesis asam folat (Achmad, 1986). Alkaloid masuk ke dalam sel bakteri akan berkompetisi dengan PABA yang menempati sisi aktif enzim yang berperan dalam sintesis asam folat yaitu hidropteroat sintetase (Prescott *et al.*, 1999). Daun anggur mengandung alkaloid, hanya malonat yang baru terdeteksi (Marais, 1983).

Menurut Cowan (1999) mekanisme senyawa terpenoid sebagai antibakteri akan bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga

pertumbuhan bakteri terhambat atau mati. Golongan terpenoid yang terkandung pada anggur seperti linalool dan geraniol (Marais, 1983).

Mekanisme senyawa fenol sebagai antibakteri pada konsentrasi rendah adalah merusak membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran inti sel, sedangkan pada konsentrasi tinggi senyawa fenol akan berkoagulasi dengan protein seluler. Hal itu sangat efektif ketika bakteri melakukan pembelahan lapisan fosfolipid disekeliling sel sedang dalam kondisi yang sangat tipis sehingga fenol dapat dengan mudah merusak isi sel (Volk and Wheller, 1984). Kandungan senyawa fenol pada daun anggur seperti resveratrol dan stilben (Papadopoulou *et al.*, 2004).

Flavonoid yang ada pada daun anggur seperti kuersetin (Papadopoulou *et al.*, 2004). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (IndoBIC, 2005).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Fraksi n-heksan, etil asetat, etanol-air ekstrak etanol daun anggur tidak mempunyai potensi sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*.
2. Senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi n-heksan daun anggur adalah flavonoid dan fenol, pada fraksi etil asetat adalah alkaloid, fenol, dan flavonoid, pada fraksi etanol-air adalah terpenoid, fenol, flavonoid, dan ekstrak etanol daun anggur adalah fenol, flavonoid, terpenoid, dan alkaloid.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap uji aktivitas antibakteri dengan peningkatan konsentrasi.

DAFTAR ACUAN

- Anjaria, J., Parabia, M., Dwivedi, S., 2002, *Ethnove Heritage Indian Ethnoveterinary Medicine – Anoverview*, India, Pathik Enterprise.
- Cowan, M. M., 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.
- Harborne, J. B., 1987, *Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Terjemahan Kokasih & Wang, S. J, ITB, Bandung
- Indonesian Biotechnology Information Centre (IndoBIC), 2005, Senyawa Antimikroba Dari Tanaman, http://indobic.or.id/berita_detail.php?id_berita=124

- Jawetz, E., Melnick, J.L. & Adelberg, E. A., 2001, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih, N.M., Harsono, S., Alimsardjono, L., Edisi XXII, 224-227, Jakarta, Penerbit Salemba Medika.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., & Sakariah, K. K., 2001, Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro, *Food Chemistry*, 73, 285–290.
- Papadopoulou, C., Kalliopi, S., & Ioannis, G. R., 2004, Potential Antimicrobial Activity of Red and White Wine Phenolic Extracts against Strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*, *Food Technol Biotechnol*, 43 (1), 41-46.
- Parekh, J. and Chanda, S., 2006, In-vitro Antimicrobial Activities of Extracts of *Launaea procumbens* Roxb. (Labiateae), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) and *Cyperus rotundus* L.(Cyperaceae), *African Journal of Biomedical Research*, 9, 89-93.
- Pratiwi, S.T., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, 174, Jakarta, Erlangga.
- Radji, M., 2010., *Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*, 67-68, 120, 125, 201, 295, EGC, Jakarta
- Sharker, D., Satyajit., Latif, Z., & Gray, I.A., 2006, *Natural Products Isolation*, 2nd Ed, New Jersey, Humana Press.